

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Laborgruppe Immunbiologie
Laborgruppenleiterin: Prof. Silvia Bulfone-Paus

Regulation of Fc epsilon receptor I-mediated mast cell degranulation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Biethahn

Kiel, Juli 2011

Referent/in: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent/in: Prof. Dr. Thomas Röder

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2011

Zum Druck genehmigt: 16.09.2011

7 Abstract

Mast cells (MCs) play an important role in acute inflammatory and allergic immune reactions. The activation of MCs via antigen-mediated triggering of the high-affinity IgE receptor FcεRI causes immediate degranulation and release of preformed mediators from secretory granules, as well as *de novo* synthesis of lipid mediators and cytokines. The regulation of this complex process is crucial for the maintenance of a balanced immune system. Therefore, the goal of this study was to understand the regulatory mechanisms underlying MC activation, in particular the role of adaptor protein SAMSN1 and microRNA miR-155. To this purpose IgE/antigen-mediated MC degranulation was investigated using murine bone marrow-derived mast cells (BMMCs) deficient for either *Samsn1* or *miR-155*.

Murine SAMSN1 (also known as HACSI or SLY2) is a putative adaptor and scaffold protein, which is predominantly expressed in hematopoietic tissues. *Samsn1* mRNA was shown to be highly expressed in BMMCs, *Samsn1*^{-/-} BMMC development however was normal. Surprisingly, *Samsn1*^{-/-} BMMCs were not impaired in any of the FcεRI-mediated MC activities investigated, including MC degranulation, cytokine production of IL-6 and TNF-α and ERK signaling. Also cell migration towards the c-kit ligand SCF was normal in *Samsn1*^{-/-} BMMCs.

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-stranded RNAs that regulate mRNA translation via RNA interference. miRNAs play a role in the maturation, proliferation, differentiation and activation of different immune cells. miR-155 is expressed in a number of immune cell types and regulates targets such as SHIP1, which is also known to control mast cell degranulation.

miR-155^{-/-} BMMCs proliferated and differentiated normally and their protease content and activity was comparable to wild-type (WT) BMMCs. Functionally, *miR-155*^{-/-} BMMCs exhibited significantly enhanced degranulation in response to FcεRI-triggering both by measurement of β-hexosaminidase release and surface expression of LAMP1 as well as increased TNF-α and IL-6 secretion. Furthermore, *miR-155*^{-/-} BMMCs displayed higher expression of phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3Kgamma) subunits *Pik3r5* (*p101*) and *Pik3r6* (*p84*, *p87*^{PIKAP}) mRNA as well as PIK3R5 protein compared to WT BMMCs, which correlated with an increased activation of AKT upon antigen stimulation of BMMCs.

Together, these results strongly suggest that miR-155 has a critical role in FcεRI-mediated MC degranulation and cytokine release by modulating the expression of adaptor proteins belonging to the PI3Kgamma pathway.

8 Zusammenfassung

Mastzellen (MZ) spielen eine wichtige Rolle in entzündlichen und allergischen Immunreaktionen. Durch die Bindung von Antigen an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf der Mastzelloberfläche wird eine Mastzellaktivierung eingeleitet. Dies führt zur sofortigen Degranulation und Freisetzung von präformierten Mediatoren aus den Mastzellgranula sowie zur Neusynthese von Lipidmediatoren und Zytokinen. Eine strenge Regulation dieses komplexen Prozesses ist essentiell um das Immunsystem im Gleichgewicht zu halten. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die regulatorischen Mechanismen der Mastzellaktivierung besser zu verstehen und dabei die Rolle des Adapterproteins SAMSN1 und der microRNA miR-155 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Antigen-vermittelte Mastzelldegranulation in Knochenmark-differenzierten MZ von *Samsn1*- und *miR-155*-defizienten Mäusen untersucht.

SAMSN1 (auch HACSI, SLY2) ist ein Adapter- und Gerüstprotein, welches hauptsächlich in hämatopoietischen Geweben exprimiert wird. MZ exprimieren große Mengen an *Samsn1* mRNA, wobei die Entwicklung von *Samsn1*^{-/-} MZ unverändert war. Überraschenderweise waren FcεRI-vermittelte Funktionen wie Degranulation, Zytokinproduktion von IL-6 und TNF-α und ERK-Signalgebung in *Samsn1*^{-/-} MZ nicht beeinträchtigt. Ebenso war die SCF-vermittelte Migration von *Samsn1*^{-/-} MZ nicht verändert.

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, einzelsträngige RNAs, die die Translation von mRNA via RNA-Interferenz regulieren. miRNAs sind wichtig für die Reifung, Proliferation, Differenzierung und Aktivierung verschiedener Immunzellen. miR-155 ist in einer Vielzahl von Immunzellarten exprimiert und reguliert Proteine wie SHIP1, welches die Mastzelldegranulation kontrolliert.

miR-155^{-/-} MZ proliferierten und entwickelten sich normal und ihr Gehalt an Proteasen sowie deren Aktivität war vergleichbar mit Wildtyp-MZ. Funktionell zeigten *miR-155*^{-/-} MZ eine signifikant gesteigerte FcεRI-vermittelte Degranulation, was sowohl durch Messung der β-Hexosaminidase-Freisetzung als auch der LAMP1 Oberflächenexpression bestimmt wurde und einen Anstieg in der TNF-α- und IL-6-Sekretion. Zudem exprimierten *miR-155*^{-/-} MZ mehr mRNA der Phosphoinositid-3-Kinase gamma (PI3Kgamma)-Untereinheiten *Pik3r5* (*p101*) und *Pik3r6* (*p84*, *p87^{PIKAP}*) sowie mehr PIK3R5 Protein, was mit einer gesteigerten Aktivierung von AKT nach Antigenstimulation korreliert.

Zusammengefasst weisen die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass miR-155 eine entscheidende Rolle in der FcεRI-vermittelten Degranulation und Zytokinfreisetzung spielt, welche durch die Modulation der Untereinheiten des PI3Kgamma Signalwegs vermittelt wird.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Dabei habe ich keine Hilfe außer der wissenschaftlichen Beratung durch meine Doktormutter Prof. Silvia Bulfone-Paus in Anspruch genommen. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, den 19.07.2011

Katharina Biethahn